약제학회지(2000), 제 30 권 제 2 호
J. Kor. Pharm. Sci., Vol. 30, No. 2, 99-105 (2000)

생쥐에 있어서 약물의 혈액 - 뇌 관문 투과성 평가를 위한 간편한 *in vivo* 방법

강영숙† · 김유정
숙명여자대학교 약학대학
(2000년 2월 18일 접수)

The Simple *in Vivo* Evaluation Method for Blood-Brain Barrier Permeability of Drugs in Mice

Young-Sook Kang† and You-Jung Kim
College of Pharmacy, Sookmyung Women's University, Seoul 140-742, Korea
(Received February 18, 2000)

ABSTRACT–This study compared the permeability of [^{3}H]taurine, [^{3}H]phenylalanine, and [^{3}H]oxytocin through the blood-brain barrier (BBB) in mice and rats with common carotid artery perfusion (CCAP) method that modified internal carotid artery perfusion (ICAP) method. External carotid artery (ECA) was cannulated with coagulating pterygopalatine artery (PPA) in ICAP method, while CCA was cannulated without coagulating PPA in CCAP method. Also, for evaluation of BBB permeability of drugs in mice and rats, we used intravenous injection technique. The results of CCAP method in mice at a perfusion flow-rate of 2 ml/min, the brian volume of distribution (V_D) of [^{14}C]sucrose, [^{3}H]taurine, [^{3}H]phenylalanine, and [^{3}H]oxytocin were similar to the result of ICAP method in rats at perfusion flow rate of 4 ml/min. The area under the plasma concentration-time curve and brain uptake of [^{3}H]taurine by intravenous injection technique, were 65.5±9.7%ID*min/ml and 0.515±0.093%ID/g, respectively, in mice, and the corresponding values were 8.00±0.03%ID*min/ml and 0.052±0.003%ID/g in rats. But the BBB permeability surface-area product of [^{3}H]taurine was similar between mice and rats. In conclusion, the CCAP method in mice was simple, fast and comparable to ICAP method in rats for drug permeability through the BBB.

Keywords–ICAP method, CCAP method, Blood-brain barrier permeability, [^{3}H]taurine, [^{3}H]phenylalanine, [^{3}H]oxytocin.

최근 생물공학과 약제학 분야에서는 새로운 중추신경계 질환 치료제들의 개발을 목적으로 *in vitro*에서는 높은 활성을 보이지만, *in vivo*에서는 제한된 활성을 나타내는 약물들에 대하여 효과적인 뇌로의 약물 uptake를 조절하고 중추신경계 작용 약물의 송달을 증진시키는 방법이 연구되고 있다.[1] 혈액-뇌 관문 (blood-brain barrier, BBB)을 통한 약물 투과를 연구하던 기존의 방법[2]에는 indicator-diffusion technique,[3] single injection external registration technique,[2] brain uptake index (BUI) technique,[4] concentration profile analysis technique, isolated perfused brain technique (internal carotid artery perfusion, ICAP)[5] 및 intravenous injection technique[5] (I.V.투여법)등이 있으며, 이 외에도 단층 모세 혈관 내피 세포 배양계를 이용한 실험법[6]과 뇌실내 관류법[7]등이 사용되어 왔다. 이러한 여러 방법 중 I.V.투여법과 ICAP법이 가장 생리학적인 방법으로 알려져 있으나,[6] I.V.투여법은 생체내에서 효소등에 의한 대사로 인하여 대사체와 미변화 활성물질의 구분이 요구되며, ICAP방법[8-9]은 아주 복잡하고 정교한 수술법을 필요로 하기 때문에, 흰쥐 정도의 크기를 가진 동물에서만 가능하며, 물질에 따라 흰쥐에 적용시킬 수 없는 경우와 흰쥐에서 생리활성을 나타내지 않는 물질에 대해서는 BBB 투과를 검토하는데 생쥐나 원숭이 등을 사용하여야 한다. 따라서 본 연구에서는 ICAP법의 단점을 보완하여 생쥐에서의 실험과 소량의 신약을 평가하기 위한 screening법을 개발하는데 적용하기 위하여 ICAP법을 변형시켜 그 투과법의 확립을 시도하고, 뇌질환 치료 약물로서의 가능성이 있는 taurine과 중성 아미노산 담체 수송계의 대표물질인 phenylalanine, 뇌혈관용적 표지체인 sucrose, 펩타이드성 물질인 oxytocin 등에 대한 생쥐에서의 BBB 투과성을 흰쥐에서 ICAP법으로 시행하여 얻어진 결과와 비교 검토하였다.

†본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
Tel : 02)710-9562, E-mail : yskang@sdic.sookmyung.ac.kr

실험방법

실험재료

[^{3}H]Taurine (specific acitivity; 24.1 Ci/mmol), [^{3}H]phenylalanine (92.0 Ci/mmol), [^{3}H]oxytocin (44.5 Ci/mmol), [^{14}C]sucrose (44.5 Ci/mmol)는 DuPont NEN제품 (부경사, 서울)을 구입하여 사용하였다.

시약 및 기기

생리식염수는 중외제약 제품을, sodium heparin은 Elkins-Sinn, Inc.을, 마취제로 사용한 염산 ketamine은 유한양행 제품을, 근이완제인 xylazine은 Loyd 실험실 제품 (종로약국, 서울)을 각각 구입하여 사용하였다. 조직 용해제인 soluene 350과 방사활성측정에 사용되는 hionic-fluor는 Packard제품 (새한산업, 서울)을 사용하였고, 기타 시약은 일급 이상의 제품을 덕산이화학 (주)에서 구입하여 사용하였다. 실험에 사용한 기기는 원심분리기 (한일 과학 산업 (주), Union 55R, Micro 17TR), infusion/withdrawl pump (KD Scientific, model 210), thermal blanket (temperature control unit, Letica, HB10 1/2), β-radioscintilating counter (Beckman, LS6500), bipolar coagulator (Union Medical Co., Surgitor UM 880-A), hot plate/stirrer (Corning, PC320), 단두기 (대종기기), pH meter (Mettler, delta 340), balance (Sartorius, AC2115), 수술 기구 등이다.

실험동물

ICR (Institute of Cancer Research)계 웅성 생쥐와 SD (Sprague-Dawley)계 웅성 흰쥐를 제일 상사와 삼육 상사에서 각각 구입하여 시판 배합 사료와 물을 자유로이 공급하면서 1-2 주 가량 동물 실험실 (숙대 약대 동물실)에서 적응시킨 후 약 30 g의 생쥐와 200-300 g의 흰쥐를 실험에 사용하였다. 동물 실험실 온도는 22-25°C, 습도는 50-60%, 조명시간은 12시간 (07:00-19:00)으로 유지하였다.

In vivo intravenous injection technique and Pharmacokinetics

약물의 pharmacokinetic profile을 측정하기 위하여, 이미 보고된 논문의 방법[10]과 마찬가지로 ketamine (100 mg/kg)과 xylazine (2 mg/kg)의 혼합액으로 근육마취시킨 후 마취시킨 25-30 g의 웅성 생쥐의 총경동맥에 폴리에칠렌관 (PE-10, Natsume Co., 정도산업)을 삽입하였다. [^{3}H]Taurine (3 μCi/생쥐)과 [^{14}C]sucrose (1 μCi/생쥐)를 Ringer's-Hepes 완충액 (RHB, pH 7.4)에 잘 혼합한 후, 경정맥을 통하여 순시 (1초이하)에 약액 50 μl를 투여하였다. 그 후 총경동맥으로부터 경시적으로 0.25, 1, 2, 5, 15, 30 및 60분에 50 μl의 혈액을 채취한 후sodium heparin (100 unit/ml)이 함유된 생리식염수 50 μl로 체액을 보충하였다. 채취한 혈액을 원심분리하여 얻어진 혈장중의 약물의 방사활성을 가용화제와 방사성물질 측정액 (hionic-fluor)을 가한 후, ^{3}H/^{14}C double-isotope liquid scintillation counting법에 의하여 측정하였다. 약액 투여 1시간 후, 즉시 단두하여 뇌, 간, 신장, 심장 및 폐를 적출하여 균질화시킨 후 일정량을 취하여 칭량한 다음, 각 조직의 방사활성을 측정하였으며 pharmacokinetic parameters는 Gibaldi와 Perrier의 정의에 따라 구하였다.[11] Pharmacokinetic parameter는 plasma radioactivity data를 UCLA Health Science Computing Facilities에서 개발한 derivative-free nonlinear regression analysis (PARBMDP, Biomedical Compute P Series)를 이용하여 biexponential equation에 적용하여 계산하였다.

$$A(t) = A_1e^{-k_1t} + A_2e^{-k_2t}$$

여기에서 A(t)는 plasma radioactivity의 %ID/ml이며 ID는 투여량이다.

Data는 1/(concentration)^{2}를 이용하였으며 여기에서 concentration은 %ID/ml을 의미한다.

Plasma clearance (CL), steady-state에서의 apparent volume of distribution (Vd_{ss}), 혈장중 농도-시간 곡선하면적 (area under the plasma concentration-time curve, AUC)과 평균체류시간 (mean residence time, MRT)은 A_1, A_2, k_1, k_2로부터 구하였다.[11]

$$CL = \frac{D}{AUC}$$

$$AUC = \frac{A_1}{k_1} + \frac{A_2}{k_2}$$

$$MRT = \frac{(A_1/k_1^2 + A_2/k_2^2)}{AUC}$$

$$Vd_{ss} = \frac{D(A_1/k_1^2 + A_2/k_2^2)}{AUC^2}$$

여기서 D는 투여량 (dose)이다.

Brain에 있어서 각 물질의 BBB permeability-surface area product (PS)는 다른 장기에서의 organ clearance rate, K_i (μl/min/g)와 동일한 의미이며 다음과 같이 계산되었다.[10]

$$PS \text{ 또는 } K_i = \frac{[V_D - V_0]Cp(T)}{\int_0^t Cp(t)dt}$$

$Cp(T)$ = 종말기의 혈장중 농도
V_0 = 혈관내용적 표식체인 [^{14}C]sucrose의 장기분포용적
V_D = 뇌 또는 각 장기에서의 물질의 분포용적

정맥 투여 일정 시간 후에 뇌 또는 다른 장기로 약물이 송달된 양은 %ID/g으로 나타내어지며 다음과 같이 BBB permeability-surface area (PS) product와 plasma AUC로 나타내어진다.[10]

$$\frac{\%ID}{g}(t) = PS \text{ 또는 } K_i \times AUC(t)$$

$$AUC(t) = \int_0^t Cp(t)dt$$

$$= \frac{A_1(1-e^{-k_1 t})}{k_1} + \frac{A_2(1-e^{-k_2 t})}{k_2}$$

여기서 K_i는 표지된 약물이 혈액으로부터 조직으로 unidirectional influx가 일어난 다음, 조직으로부터 혈액으로의 efflux가 일어난 정도를 나타내는 것으로 organ uptake는 injection후에 주어진 시간에서의 %ID/g로 나타내어진다.[10]

Internal carotid artery perfusion method (ICAP)

마취시킨 200-300 g의 웅성흰쥐의 목부위를 절개하여 이미 보고한 논문의 방법대로[2] 혈관들을 분리하여 전기결찰하였다. 오른쪽 외경동맥에 PE-10관을 삽입하여 infusion pump에 연결하였다. 수술하는 동안에는 thermal blanket을 이용하여 흰쥐의 체온을 37°C로 유지하였다. Kreb's-Henseleit buffer에 [^{3}H]phenylalanine (3 μCi/ml)과 [^{14}C]sucrose (1 μCi/ml)를 잘 혼합하여 4 ml/min으로 infusion함과 동시에 총경동맥을 수술실로 결찰하였다. Infusion 후 정확히 15초가 되었을 때 즉시 단두하여 뇌를 적출하고, 균질화하여 무게를 측정하였다. 뇌의 homogenate를 가용화제로 용해시킨 후 [^{3}H] 및 [^{14}C]의 방사활성을 측정하였다.

Common carotid artery perfusion method (CCAP)

이미 보고된 논문의 방법[1]을 참고로하여 마취시킨 25-30 g의 웅성 생쥐와 200-300 g의 웅성 흰쥐의 목부위를 절개하여 오른쪽 외경동맥을 분리하여 전기결찰하고, 기타 다른 혈관은 전기결찰하지 않고 그대로 방치한다. 오른쪽 총경동맥을 분리하여 생쥐에는 PE-10관을, 흰쥐에는 PE-50관을 삽입하여 infusion pump에 연결하였다. Kreb's-Henseleit buffer에 [^{3}H]taurine과 [^{14}C]sucrose를 잘 혼합하여 ICAP법에서 사용하는 관류속도와 동물의 체중에 비례하여 생쥐에서는 2 ml/min으로, 흰쥐에서는 20 ml/min으로 infusion하였다. Infusion한 후 정확히 10, 15, 30초가 되었을 때 즉시 단두하여 뇌를 적출하고, 균질화하여 무게를 측정하였다. [^{3}H]taurine대신 [^{3}H]phenylalanine 및 [^{3}H]oxytocin도 같은 방법으로 실험하여 infusion한 후 15초에서 단두하였다. 뇌의 homogenate를 용해시킨 후 [^{3}H] 및 [^{14}C]의 방사활성을 측정하였다.

ICAP법과 CCAP법을 이용한 후에 V_D와 PS를 구하는 식은 다음과 같다.[6]

$$V_D(\mu l/g) = \frac{brain(dpm)/brain(g)}{perfusate(dpm)/perfusate\ volume(\mu l)}$$

$$PS(\mu l/min/g) = \frac{V_D(\mu l/g)}{perfusion\ rate\ (min)}$$

결과 및 고찰

***In vivo* intravenous injection technique and Pharmacokinetics**

[^{3}H]Taurine과 plasma volume marker인 [^{14}C]sucrose를 흰쥐와 생쥐에 정맥 투여한 후 60분 동안 순환하여 말초혈액에서 나타내는 혈장중 약물의 농도를 투여한 약물량에 대하여 %ID/ml로 표시하여 Figure 1에 나타내었다. 이 결과로부터 [^{3}H]taurine과 [^{14}C]sucrose는 모두 biexponential equation에 따라 plasma compartment로부터 빠르게 소실하였으

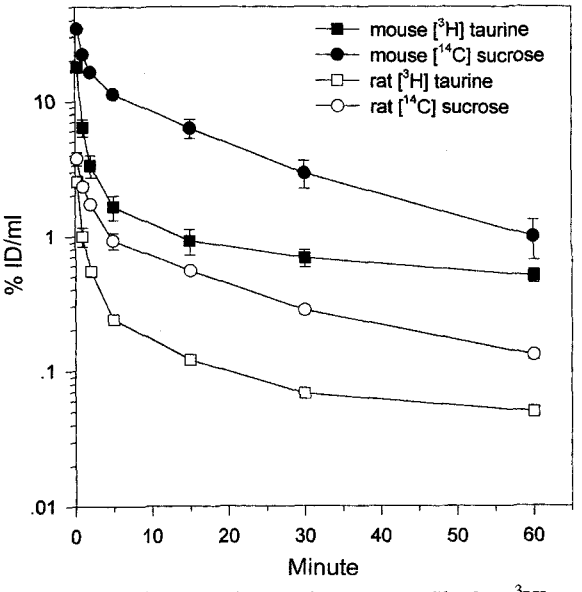

Figure 1–Comparison of plasma clearance profile for [^{3}H]taurine and [^{14}C]sucrose in mice and rats. The percentage of injective dose (ID) per milliliter of plasma-time profile of [^{3}H]taurine and [^{14}C] sucrose in mice and rats, after intravenous injection of the injectate for up to 60 min. Data values are mean ± S.E.M.(n=3).

며, 사용한 동물의 종차에 따라 그 절대값의 차이는 있으나 [^{3}H]taurine과 [^{14}C]sucrose가 유사한 양상으로 혈장중에서 소실되고 있음을 알 수 있다. 흰쥐와 생쥐에서 [^{3}H]taurine의 혈액-뇌 관문 (BBB) 고유 투과 상수인 PS 값은 각각 7.4와 8.7 μl/mim/g로 거의 유사하며, 혈장중농도 곡선하면적 (AUC)이 생쥐에서 약 8.2배 큰값을 나타내었다. 따라서 PS 값과 AUC의 곱에 의해 결정되어지는 [^{3}H]taurine의 뇌투과량 (%ID/g)은 생쥐에서 약 9.0배가 큰 것으로 종의 차이를 나타내었다(Table I). 생쥐에서의 taurine의 체내동태에 대해서는 [^{3}H]taurine의 혈장중 전신 clearance (CL)가 39.8±3.5 ml/min/kg로 혈장용적 표지체인 [^{14}C]sucrose보다 약 3.3배정도 빠르며, elimination half-life는 40.5±3.7분이었으며 steady-state에서의 분포용적 (Vd_{ss})은 1930±320 ml/kg으로 [^{14}C]sucrose보다 8.1배 이상 더 크게 나타났다(Table II).

Internal carotid artery perfusion method (ICAP)에 의한 혈액 - 뇌 관문(BBB) 투과성

뇌 관문 (BBB) 투과성 본 실험에서는 [^{3}H]phenylalanine과 [^{14}C]sucrose를 15초 동안 흰쥐의 brain에 4 ml/min의 속도로 perfusion했을 때의 brain distribution volume (V_D)을 측정하였다. 분자량이 165이며 뇌모세혈관에 존재하는 담체수송계인 large neutral amino acid (LNAA) system에 의해 수송되는 phenylalanine이 158±33 μl/g으로 가장 큰 값을 나타내었고 이것을 PS값으로 계산하면 608±129 μl/mim/g으로 이미 보고된 논문 값과 유사한 결과를 나타내었다.[12] 또한 taurine에 있어서도 다른 논문에서 보고한 PS값[13-14] (약 70-120 μl/mim/g)과 유사한 66±8 μl/mim/g을 나타내었고 sucrose와 oxytocin의 BBB투과는 거의 나타나지 않았다 (Table III).

Common carotid artery perfusion method (CCAP)

[^{3}H]Taurine과 [^{14}C]sucrose를 10초, 15초, 30초 동안 생쥐의 brain에 CCAP 법으로 2 ml/min의 속도로 perfusion했을 때의 brain distribution volume (V_D)을 측정하였다. [^{3}H]Taurine과 [^{14}C]sucrose를 CCAP method로 투여한 경우, perfusion time이 증가함에 따라 [^{14}C]sucrose의 brain uptake는 증가하지 않고 거의 일정하나, [^{3}H]taurine은 직선성을 나타내며 증가하였다(Figure 2). 이것은 taurine이 시간의존적으로 특수수송계를 통하여 뇌로 투과되고 있음을 보여주고 있다. [^{14}C]Sucrose의 뇌혈관 분포용적으로 보정한 [^{3}H]taurine의 permeability surface-area product (PS)값은 15초에서 최대를 나타내었고 그 이후에 급속히 감소하는 경향을 보이는데 이것은 이미 연구되어진 논문에서 보고된 사실과 일치하며,[13] 뇌혈관의 세포질 부위에서 혈액 쪽으로 taurine이 빠르게 efflux되는 것으로 사료된다(Figure 3). 생쥐에서 CCAP 법을 사용한 경우와 흰쥐에서 ICAP법을 사용한 경우의 결과는 10초, 15초, 30초 모두에서 거의 비슷한 taurine의 뇌분포용적을 나타내었다(Figure 4). 이것은 두가지 방법에 차이가 없음을 나타냄으로써 생쥐에서 CCAP법이 간편하게 사용할 수 있는 가능성을 시사하고 있다. 또한, [^{3}H]phenylalanine과 [^{3}H]oxytocin을 15초 동안 2 ml/min의 속도로 생쥐의 뇌로 perfusion했을 때의 V_D는 각각 130±37, 6.72±1.24 ml/g으로 흰쥐에서 ICAP 법으로 15초 동안 perfusion했을 때의 158±33, 8.15±0.21 ml/g과 거의 유사하다(Table II). 그러나 [^{3}H]taurine, [^{14}C]sucrose, [^{3}H]phenylalanine과 [^{3}H]oxytocin을 각각 15초 동안 흰쥐의 뇌로 20 ml/min의 속도로 perfusion했을 때의 V_D는 생쥐에 CCAP법을 적용하였을 때나 흰쥐에 ICAP법을 적용하였을 때보다 각각 1.8배, 1.6배, 2.3배, 4.9배 정도 큰 값을 나타내었다(Table III, Figure 5). 그러므로 흰쥐에 CCAP법을 적용하는 것은 바람직 하지 않음을 알 수 있다.

이상과 같이 혈액 - 뇌 관문 투과성 평가를 위하여 사용된 taurine은 허혈, 저산소증, 발작, 노화, 고혈압, Alzheimer's disease등 중추성질환에 밀접한 상관성을 나타내는 것으로 보고되고 있으며[15-16] 중추에 작용하는 뇌질환 치료제의 개발을 위한 후보 물질로의 가능성을 시사하고 있다. 특히 taurine은 분자량이 작지만 수용성이며 뇌모세혈관에 존재하는 small amino acid system을 이용하여 수송된다고 보고되어 있다. Taurine은 luminal membrane과 antiluminal membrane

Table I–*Comparison of Brain Uptake of [^{3}H]taurine and [^{14}C]sucrose in Mice and Rats by Intravenous Injection Technique*

brain uptake	[^{3}H]taurine		[^{14}C]sucrose	
	mice	rats	mice	rats
$AUC_{0\rightarrow60}$ (%ID*min/ml)	65.5 ± 9.7	8.00 ± 0.03	290 ± 39	27.3 ± 0.5
V_D (μl/g)	1260 ± 230	119 ± 079	182 ± 90	68.0 ± 8.5
PS (μl/min/g)	8.66 ± 2.70	7.39 ± 0.76	0.98 ± 0.21	0.33 ± 0.05
%ID/g	0.52 ± 0.09	0.058 ± 0.003	0.27 ± 0.04	0.0091 ± 0.0013

Brain uptake of [^{3}H]taurine and [^{14}C]sucrose in mice and rats, after intravenous injection of the injectate for up to 60 min. Data values are mean ± S.E.M. (n=3)

Table II–*Pharmacokinetic Parameters Obtained with Intra-Venous Injection Technique in Mice*

parameter	[^{3}H] taurine	[^{14}C] sucrose
A_1(%ID/ml)	20.0 ± 0.5	25.8 ± 2.6
A_2(%ID/ml)	1.33 ± 0.29	11.9 ± 1.1
k_1(min^{-1})	1.22 ± 0.15	0.79 ± 0.14
k_2(min^{-1})	0.017 ± 0.002	0.044 ± 0.005
$t_{1/2}$(min)		
Distribution	0.59 ± 0.06	0.92 ± 0.14
Elimination	40.5 ± 3.7	15.9 ± 1.8
$AUC_{0\rightarrow 60}$(%ID*min/ml)	65.5 ± 9.7	290 ± 39
AUC_t(%ID*min/ml)	91.5 ± 10.2	312 ± 49
Vd_{ss}(ml/kg)	1930 ± 320	239 ± 9
CL(ml/min/kg)	39.8 ± 3.5	12.0 ± 1.8
MRT(min)	47.9 ± 4.0	20.5 ± 3.0

Pharmacokinetic parameters were estimated from plasma profile data up to 60 min in mice. Data values are mean ± S.E.M. (n=3)
$t_{1/2}$: half time , Vd_{ss} : volume of distribution at the steady-state
CL : plasma clearance , MRT : mean residence time

Table III–*Volume of Distribution and Permeability-Surface Area Product for Each Compound Using ICAP and CCAP Method*

		mouse CCAP	rat ICAP	rat CCAP
perfusion rate		2 ml/min	4 ml/min	20 ml/min
sucrose	V_O	6.55 ± 1.39	6.11 ± 0.70	10.3 ± 0.6
taurine	V_D	18.5 ± 1.6	22.7 ± 2.6	32.5 ± 5.1
	PS	44.1 ± 4.9	66.4 ± 7.6	88.8 ± 18.0
phenylalanine	V_D	130 ± 37	158 ± 33	302 ± 28
	PS	494 ± 142	608 ± 129	1167 ± 110
oxytocin	V_D	6.72 ± 1.24	*8.15 ± 0.21	33.1 ± 5.5
	PS	0.68 ± 0.28	*0.36 ± 0.04	91.2 ± 19.6

Brain were perfused for 15 second at a rate of 2 ml/min by common carotid artery perfusion in mice, 4 ml/min by internal carotid artery perfusion in rats and 20 ml/min by common carotid artery perfusion in rats, respectively, except oxytocin. Data values are mean ± S.E.M. (n=3)
* : perfusion flow rate; 1 ml/min, perfusion time; 5 min.
V_D μl/g) : volume of brain distribution.
PS (μl/min/g) : V_O corrected permeability-surface area product for blood-brain barrier

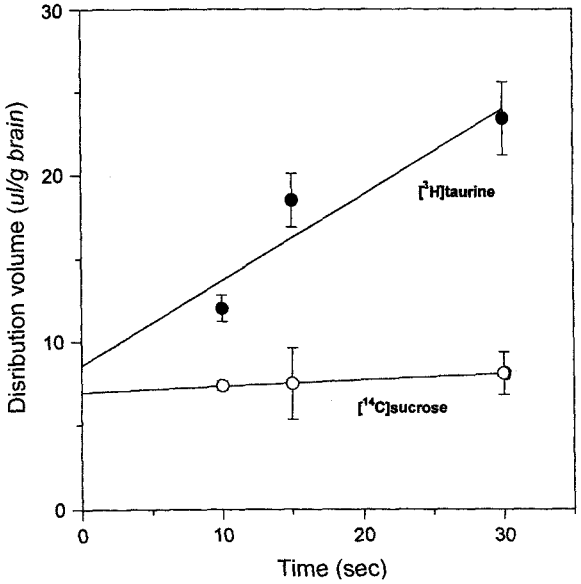

Figure 2–Brain distribution volume of [^{3}H] taurine and [^{14}C] sucrose in mice right brain by CCAP method. Linear regression of [^{3}H]taurine and plasma volume marker, [^{14}C]sucrose after common carotid artery perfusion at a rate of 2 ml/min for 10, 15 and 30 second in anesthetized mice. Data values are mean ± S.E.M.(n=3).

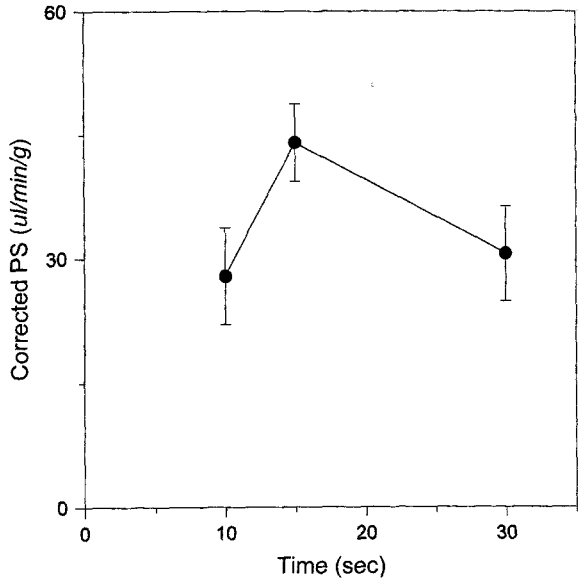

Figure 3–Corrected PS product in mice right brain by CCAP method. Data values are mean ± S.E.M.(n=3). Blood-brain barrier permeability surface area product of [^{3}H]taurine corrected with plasma volume marker, [^{14}C]sucrose after common carotid artery perfusion at a rate of 2 ml/min for 10, 15 and 30 seconds in mice.

모두에서 carrier-mediated transport system을 통해 sodium, chloride이온에 의존적인 수송을 나타낸다[13] 또한 생쥐에서 taurine의 뇌대사물에 의한 뇌투과성의 변화 등에 대해서는 추후 좀더 검토해야할 것으로 생각된다 한편, phenylalanine은 지용성이 taurine에 비하여 크고, 분자량이 작은데다가 뇌모세혈관에 존재하는 large neutral amino acid (LNAA) carrier system[17-19]을 이용하기 때문에 뇌로의 투과량이 taurine보다 크다. 이와같은 결과는 본 연구에서도 동일하게 나타나 본 연구방법의 타당성이 입증되었다. 또 sucrose는 plasma volume marker로 뇌로 거의 들어가지 않으며, 따라서 다른 물질과의 투과 정도를 비교하기 위한 기준 물질로 사용하였으며, 분자량에 따른 뇌투과 효과를 검토하기 위하여 진통효과를 나타내는 고분자 물질인 oxytocin을 사용하여 같은 실험을 한 결과 다른 peptide성 약물과 마찬가지로 뇌로의 투과가 거의 나타나지 않음을 알 수 있었다.[20-23]

본 논문에서 적용된 CCAP법은 BUI법과 거의 유사하게

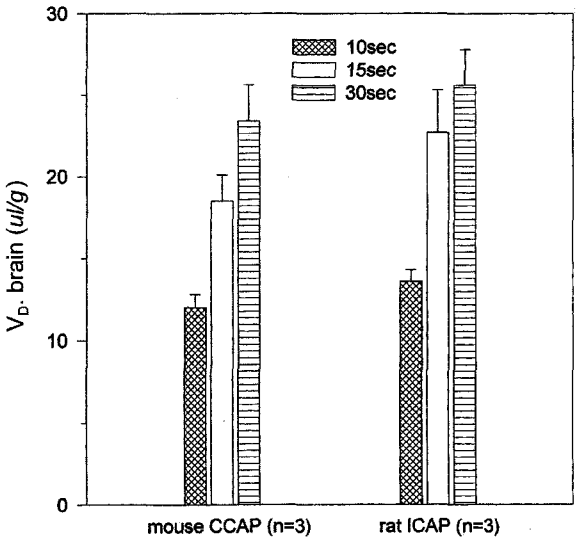

Figure 4–Brain permeability of taurine in mice and rats. Brain permeability of [^{3}H]taurine after common carotid artery perfusion at a rate of 2 ml/min in mice and internal carotid artery perfusion at a rate of 4 ml/min in rats for 10, 15 and 30 seconds. Data values are mean ± S.E.M.(n=3).

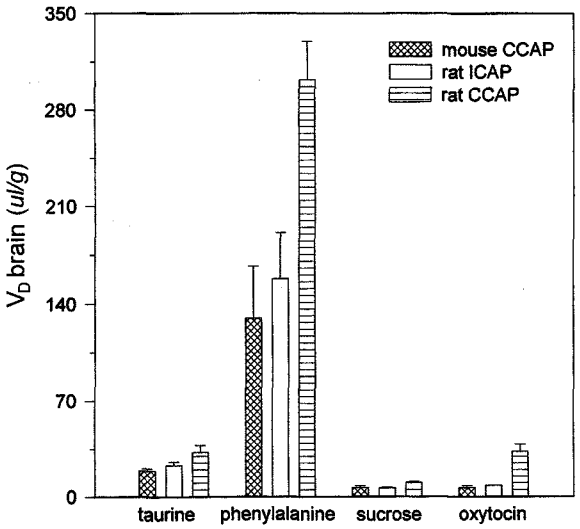

Figure 5–Volume of distribution for each compound using ICAP and CCAP method. Brain were perfused for 15 seconds at a rate of 2 ml/min by common carotid artery perfusion in mice, 4 ml/min by internal carotid artery perfusion in rats and 20 ml/min by common carotid artery perfusion in rats, respectively. Data values are mean ±S.E.M. (*n*=3).

경동맥에만 관류시키는 방법으로 수술방법이 외경동맥만 결찰하고 pterygopalatine은 결찰하지 않아서 ICAP법에 비하여 매우 신속하게 이루어지는 데 반하여 빠른 관류속도 (ICAP법의 약 5-20배)가 요구되고 양쪽 대뇌반구에 수송되며 최고 2분까지 관류시킬 수 있기 때문에, mixing 효과가 나타나고 brain transit time이 1초 정도로 sensitivity가 제한되어 있어 특히 peptide약물의 평가에는 적합하지 않은 BUI법의 단점 등이 보완되는 평가법[1]으로 Smith,[24] Takada[25] 및 Rabin[26] 등에 의해 혈류의존성 수송 또는 대사연구에 흰쥐에서 시행되었으나 생쥐에서의 실험은 시도되지 않았다. 물론 생쥐에서도 확대경을 사용하고 3배이상의 시간과 노력을 투여하면 ICAP법을 사용하여 약물의 BBB투과성 평가가 가능함을 다른 실험 (mouse transferrin monoclonal antibody 실험-추후투고예정)에서 확인하였지만, 본 연구에서는 생쥐에서만 평가가 가능한 특이성 약물 또는 소량 합성된 신약 후보물질의 BBB투과성 평가에 대비하여 CCAP법의 적용이 가능한 지를 흰쥐에서의 ICAP법과 비교검토하여 보고 하고자 하였다.

결 론

생쥐에서 약물의 혈액-뇌 관문 투과성을 검토하는 방법에 대하여 연구한 결과, 다음과 같은 결론을 얻었다. [^{3}H]Taurine은 생쥐에 전신 투여 시, 혈중에서 빠른 소실 양상을 보이며 흰쥐와 생쥐의 brain uptake에 있어서 10배 정도의 차이를 나타내었다. 한편, [^{3}H]taurine은 생쥐에서 뇌로 관류한 후 15초에서 최대의 PS값을 보였으며, 그 이후에는 뇌에서 혈액 쪽으로의 빠른 efflux로 인하여 급격히 감소되었다. 또한 다양한 분자량의 서로 다른 4가지 물질을 생쥐에서 internal carotid artery perfusion (ICAP)법을 변형시킨 common carotid artery perfusion (CCAP)법으로 적용시켜 각 물질의 뇌투과 클리어런스를 검토한 결과, 흰쥐에서 ICAP법을 사용하였을 때와 거의 같은 값을 나타내기 때문에 생쥐에는 CCAP법을 적용함으로써 빠르고 간편하게 소량으로 약물의 뇌투과성을 검토할 수 있다고 사료된다.

감사의 말씀

본 연구는 KISTEP 1999년도 숙명여자대학교 연구기반 확충사업의 지원으로 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

문 헌

1) Q.R. Smith, Brain perfusion system for studies of drug uptake and metabolism in the central nervous system: In *Models for Assessing Drug Absorptiion and Metabolism*, Plenum Press, New York, pp. 285-307 (1996).

2) Y. Takasato, S.I. Rapoport and Q.R. Smith, An in situ brain perfusion technique to study cerebrovascular transport in the rat, *Am. J. Physiol.*, **247**, H484-H493 (1984).

3) D.L. Yudilevich and N. Rose., Blood-brain transfer of glucose and other molecules measured by rapid indicator dilution, *Am. J. Physiol.*, **220**, 841-846 (1971).
4) J.E. Hardebo and B. Nilsson, Estimation of cerebral extraction of circulating compounds by the brain uptake index method: influence of circulation time, volume injection, and cerebral blood flow, *Acta. Physiol. Scand.*, **107**, 153-159 (1979).
5) J. Fenstermacher, R. Blasterg and C. Patlak, Methods for quantifying the transport of drugs across the brain barrier system, *Pharmcol. Ther.* **14**, 217-248 (1981).
6) W.M. Pardridge, *Peptide drug delivery to the brain*, Ravan Press, New York, pp. 1-357 (1991).
7) W.M. Pardridge, Vector-mediated peptide drug targeting to the brain, In: *Peptide and Protein Drug Research*, Alfred Benzon Symposium 43, Munksgaard, Copenhagen, pp. 1-12 (1998).
8) Y. Takasato, Q.R. Smith and S.I. Rapoport, A new method to determine cerebrovascular permeability in anesthetized rat, *Soc. Neurosci.* Abstr. **8**, pp. 850 (1982).
9) G.B. Richerson and P.A. Getting, Preservation of integrative function in a perfused guinea pig brain, *Brain Res.*, **517**, 7-18 (1990).
10) W.M. Pardridge, Y.S. Kang, J. Yang and J.L. Buciak, Enhanced cellular uptake and *in vivo* biodistribution of a monoclonal antibody following cationization, *J. Pharm. Sci.*, **84**, 943-948 (1995).
11) M. Gibaldi and D. Perrier, *Pharmacokinetics*, Marcel Dekker Inc., New York (1982).
12) W.M. Pardridge, Recent advances in blood-brain barrier transport. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **28**, 25-39 (1988).
13) I. Tamai, M. Senmaru, T. Terasaki and A. Tsuji, Na(+), and Cl(-) dependent transport of taurine at the blood-brain barrier, *Biochem. Pharmacol.*, **27**, 1783-1793 (1995).
14) H. Benrabh, J.-M. Bourre and J.-M. Lefauconnier, Taurine transport at the blood-brain barrier: an *in vivo* brain perfusion study, *Brain Res.*, **692**, 57-65 (1995).
15) R.J. Huxtable, Taurine in the central nervous system and the mammalian action of taurine, *Prog. Neurobiol.*, **32**, 471-533 (1989).
16) J.B. Lombardini, Recent studies on taurine in the central nervous system, In *Taurine*, Plenum Press, New York, pp. 245-251 (1992).
17) Q.R. Smith, S. Momma, M. Aoyagi and S.I. Rapopart, Kinetics of neutral amino acid transport across the blood-brain barrier, *J. Neurochem.*, **49**, 1651-1658 (1987).
18) S.R. Ennis, R. Xiao-Dan and A.L. Betz, Transport of α-aminoisobutyric acid across the blood-brain barrier *in situ* perfusion of the rat, *Brain. Res.*, **643**, 100-107 (1994).
19) W.M. Pardridge, Brain metabolism; a perspective from the blood brain barrier, *Physiol. Rev.*, **63**, 1481-1535 (1983).
20) S.M.A. Zaidi and H. Heller, Can neurohypophysical hormones cross the blood-cerebrospinal fluid barrier? *J. Endocr.*, **60**, 195 (1974).
21) B.J. Mens and A. Witter, Penetration of neurohypophysical hormones from plasma into cerebrospinal fluid (CSF), half-times of disappearance of these neuropeptides from CSF, *Brain Res.*, **262**, 143 (1983).
22) G. Meisenberg and W.H. Simmons, Peptides and blood-brain barrier, *Life Sci.*, **32**, 2611 (1983).
23) W.M. Pardridge, Transport of nutrients and hormones through the blood-brain barrier, *Fed. Proc.*, **43**, 201 (1984).
24) Q.R. Smith, S. Fukui, P. Robinson and S.I. Rapoport, Influence of cerebral blood flow of tryptophan uptake into brain, In: *Amino Acids: Chemistry, Biology and Medicine* (G. Lubec. and G.A. Rosenthal eds.), ESCOM Science Publishers, Leiden, pp. 364-369 (1990).
25) Y. Takada, N.H. Greig, D.T. Vistica, S.I. Rapoport and Q.R. Smith, Affinity of antineoplastic amino acid drugs for the large neutral amino acid transporter of the blood-brain barrier, *Cancer Chemother. Pharmacol.*, **29**, 89-94 (1991).
26) O. Rabin, L. Hegedus, J.M. Bourre and Q.R. Smith, Rapid brain uptake of manganese (II) across the blood-brain barrier, *J. Neurochem.*, **61**, 509-517 (1993).